

1 English summary

Spinal muscular atrophy (SMA) is a motor neuron disorder and the most frequent cause of genetic death in childhood. SMA is caused by deletion, gene conversion or in some cases small subtle mutations in the *survival motor neuron 1 gene* (*SMN1*), while the severity is mainly determined by the number of *SMN2* copy genes. Plastin 3 has been identified as a fully protective modifier of SMA in humans and confirmed in various animal models: worm, fly, zebrafish and mice overexpressing PLS3. PLS3 is an F-actin binding and bundling protein and overexpression rescues F-actin dependent processes at neuromuscular junction level in SMA mice. To understand the protective function of PLS3 in SMA, the interactome of PLS3 was investigated in this thesis. By using stably Flag/His PLS3 overexpressing HEK293T cells, affinity purification and mass spectrometry, 168 proteins were identified as PLS3 binding partners. PLS3 binding partners are associated with several categories of neurodegenerative disorders including Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), Charcot-Marie-Tooth (CMT) and Ataxia. As reduced SMN level impairs F-actin dependent processes and PLS3 is involved in F-actin dynamics, Coronin 1C (CORO1C) and Tropomodulin 3 (TMOD3) – two proteins known to interact with actin – were investigated in details. PLS3 showed direct interaction with CORO1C through its β -propeller domain in a calcium dependent manner. Instead, TMOD3 only associated but not directly interacted with PLS3. To see whether PLS3 binding partners are able to rescue the motor neuron phenotype in fish, PLS3, CORO1C or TMOD3 were overexpressed in *Smn* depleted fish. PLS3 and CORO1C but not TMOD3 was able to rescue the axonal truncation and branching phenotype in *Smn*-depleted fish. *In vivo* G/F-actin assay showed reduced amount of F-actin upon SMN downregulation in both HEK293T and NSC34 cells. It is well known that F-actin is crucial in endocytosis and depletion of Sac6p (the ortholog of PLS3 in yeast) has been shown to impair endocytosis. We hypothesized that reduced SMN level disturbs F-actin dynamics, this leads to impaired endocytosis which can be rescued by restoring F-actin dynamics via PLS3 or CORO1C overexpression. Flow cytometry analysis showed that the uptake of FITC-Dextran as a known marker for fluid-phase endocytosis is significantly reduced in SMN-depleted NSC34 and HEK293T cells. Furthermore, investigations on the possible role of SMN on clathrin-mediated endocytosis showed no difference between control and SMN-depleted NSC34 cells. The fluid phase endocytosis defect in the SMN-depleted cells was significantly rescued by PLS3 and CORO1C but not TMOD3 overexpression. Moreover, downregulation of PLS3 and CORO1C by siRNA impaired endocytosis. In an attempt to screen compounds with increasing effect on fluid-phase endocytosis, we demonstrated that the FDA-approved drug Fingolimod (FTY720) but not Y62732 markedly restored the amount of fluid phase endocytosis. FTY720 was able to restore reduced endocytosis in SMN-depleted cells. Further experiments are needed to assess the possible therapeutic effect of FTY720 in the SMA mouse model.

Based on disturbed vesicular transport processes in SMN-depleted cells, we expected a possible mis-regulation in most trafficking events including exocytosis. Assaying for the amount of released cathepsin D and GAPDH showed a secretion defect in SMN-deficient cells. We demonstrated that the amount of released GAPDH and cathepsin D are significantly increased upon SMN downregulation. Further characterization of cathepsin D and GAPDH in the spinal cord samples of SMA and HET mice did not show any difference at protein level. As mis-localization of cathepsins is a hallmark of ALS and cathepsins play a possible role in neurodegeneration, further experiment are needed to study cathepsin D and GAPDH localization in the lumbar region of the spinal cord in SMA animals. Our results regarding endo- and exocytosis defects in SMN-depleted cells suggests a vesicular trafficking deficit in SMA. Further secretome analysis experiments in SMN-depleted motor neurons can delineate what other possible regulatory proteins might be secreted beside cathepsin D and GAPDH. Five of seven amino acyl tRNA synthetases (aaRSs) identified in our screen as PLS3 binding partners are implicated in Charcot-Marie-Tooth (CMT) diseases, a group of neurodegenerative disorders of the central and peripheral nervous system. Mutations in aminoacyl tRNA synthetases for tyrosine (YARS), lysine, (KARS) and methionine (MARS) cause CMT. In an unbiased modifier screen, *PLS3* and *Coronin* have been identified as genetic modulators of the neurodegenerative phenotype in the fly. Down-regulation of either *PLS3* or *Coronin* has rescued the eye phenotype in mutated-*YARS*-overexpressing fly in contrast to wild type *YARS*-overexpressing fly (Biljana Ermanoska, Albena Jordanova, VIB Department of Molecular Genetics, University of Antwerp, Belgium, personal communication). By size exclusion chromatography we demonstrated here that the amount of mutant YARS protein was reduced in highly enriched PLS3 fractions and the mutant protein is mostly enriched in higher size complexes in comparison with WT. Further mass spectrometry analysis of purified large WT and mutant YARS complexes suggested a decreased binding of YARS p.E196K to translation initiation factor 4B and nuclease sensitive binding protein 1. Changed oligomerization activity has been shown for mutations in glycine tRNA synthetase (GARS) as one of the CMT-causing genes. Since our mass spectrometry data did not explain the molecular shift in mutant YARS complexes, we hypothesized a changed oligomerization activity of YARS p.E196K is responsible for the changes in complex sizes. Co-IP results confirmed a weaker binding of mutant YARS to PLS3. Moreover, flow cytometry analysis of the FITC-Dextran uptake showed an increased fluid phase endocytosis in stably overexpressing mutant YARS in comparison to WT YARS overexpressing HEK293T cells. The decrease in endocytosis in SMA in contrast to an increased endocytosis in CMT might also explain the opposite rescuing role of modifiers in both disorders. Our results emphasizes the important role of PLS3 in F-actin-dynamic and endocytosis, and thereby modulating the pathogenesis of different neurodegenerative disorders.

German summary

Spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine Erkrankung der Motoneurone und die häufigste genetische Todesursache in der Kindheit. SMA ist bedingt durch Deletion, Genkonversion oder seltener durch Punktmutationen im *survival motor neuron 1 (SMN1)* Gen, wobei der Schweregrad der Erkrankung durch die Anzahl der weitestgehend identischen *SMN2* Genkopien moduliert wird. Beim Menschen wurde Plastin 3 (PLS3) als weiterer schützender modifizierender Faktor der SMA entdeckt und in überexprimierenden Tiermodellen wie Wurm, Fliege und Zebrafisch bestätigt. Plastin 3 ist ein F-Aktin bindendes und –bündelndes Protein und seine Überexpression stellt gestörte F-Aktin abhängige Prozesse in motorischen Endplatten von SMA Mäusen wieder her. Um zu verstehen wie PLS3 vor SMA schützt, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Interaktom von PLS3 untersucht. Durch die stabile Überexpression von FLAG/His-PLS3 in HEK293T Zellen, Proteinaufreinigung und Massenspektrometrie wurden 168 Proteine als Bindungspartner von Plastin 3 identifiziert. Diese sind mit verschiedenen Gruppen von neurodegenerativen Erkrankungen wie amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Charcot-Marie-Tooth (CMT) und Ataxie assoziiert. Da verminderte SMN Level Aktin-abhängige Prozesse stören und PLS3 selbst in der Regulation der Aktindynamik involviert ist, wurden die zwei Interaktoren, Coronin 1C (CORO1C) und Tropomodulin 3 (TMOD3) detailliert untersucht. Genau wie PLS3 interagieren beide mit Aktin. Für PLS3 wurde die direkte und Calcium-abhängige Interaktion mit der β -Propeller Region von CORO1C nachgewiesen. Im Gegensatz dazu, interagiert TMOD3 nur indirekt mit PLS3. Um mögliche modifizierende bzw. rettende Effekte dieser PLS3 Interaktoren auf Motoneuronebene zu untersuchen, wurde PLS3, CORO1C oder TMOD3 in *Smn* defizienten Zebrafischen überexprimiert. PLS3 und CORO1C, jedoch nicht TMOD3 konnten den durch die *Smn* Defizienz bedingten Phenotyp (z.B. verkürzte Axone, stärkere Verzweigung der Motoneurone) entgegenwirken. In SMN-defizienten HEK293T und NSC34 Zellen wurde mittels *in vivo* F/G-Aktin Assay eine Verminderung an filamentösem Aktin nachgewiesen. F-Aktin kommt eine bedeutende Rolle bei der Endozytose zu und Herabregulation von Sac6p, dem PLS3 Ortholog in *S. cerevisiae*, führte gleichermaßen zu verminderter Endozytose. Dies lässt vermuten, dass reduzierte SMN Level die Aktindynamik stören, was zu einer verminderten Endozytose führt. Überexpression von PLS3 oder CORO1C sollte demnach durch Wiederherstellung der Aktindynamik auch der Verminderung der Endozytose entgegenwirken. Analyse mittels Durchflusszytometrie zeigte eine signifikant reduzierte endozytotische Aufnahme von FITC-Dextran (Makropinozytose) in SMN-defizienten HEK293T und NSC34 Zellen. Die Clathrin-vermittelte Endozytose wurde durch Reduzierung der SMN Level in NSC34 Zellen nicht beeinträchtigt. Die durch SMN Defizienz verminderte FITC-Dextran Aufnahme konnte durch Überexpression von PLS3 und CORO1C, jedoch nicht von TMOD3 wiederhergestellt werden.

Des Weiteren führte die siRNA vermittelte Herabregulation von PLS3 und CORO1C zu verminderter Endozytose. Im Bestreben Substanzen zu identifizieren, welche Makropinozytose zu steigern vermögen, konnten wir für die von der FDA zugelassene Substanz Fingolimod (FTY720) eine deutliche Steigerung der Makropinozytoseaktivität in SMN defizienten Zellen nachweisen. Der mögliche therapeutische Nutzen von FTY720 sollte demnächst im SMA Mausmodell evaluiert werden. Auf Grund der gestörten vesikulären Transportprozesse in SMN defizienten Zellen ist möglicherweise eine Misregulation vieler zellulärer Transportprozesse - Exozytose eingeschlossen – zu erwarten. In der Tat zeigten Messungen in SMN defizienten Zellen signifikant erhöhte Mengen an sekretiertem Cathepsin D und GAPDH. Weitere Untersuchungen zeigten keine allgemeinen Expressionsunterschiede von Cathepsin D und GAPDH im Rückenmark von SMA Mäusen verglichen mit HET Mäusen. Falsche zelluläre Lokalisation von Cathepsinen ist charakteristisch für ALS und trägt dort möglicherweise zu neurodegenerativen Prozessen bei. Daher sollte die Lokalisierung von Cathepsin und GAPDH in der Lumbalregion des Rückenmarks in SMA Mäusen genauer charakterisiert werden. Unsere Ergebnisse zu Endo- und Exozytosedefekten in SMN-defizienten Zellen, lassen auf einen allgemeinen Defekt des Vesikeltransports bei der spinalen Muskelatrophie schließen. Detaillierte Analysen des Sekretoms von SMN defizienten Motoneuronen könnten aufdecken, welche anderen regulatorischen Proteine neben Cathepsin D und GAPDH anomal sekretiert werden. Fünf von sieben Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (AARS), die in unserer Untersuchung als PLS3 Interaktor identifiziert wurden, sind als Krankheitsgene mit dem CMT Spektrum, einer Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen des zentralen und peripheren Nervensystems, assoziiert. Mutationen in den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen für die Aminosäuren Tyrosin (YARS), Lysin (KARS) und Methionin (MARS) sind ursächlich für CMT. Plastin 3 and Coronin wurden in einer unbefangenen Studie als genetische Modulatoren neurodegenerativer Phänotypen in der Fliege identifiziert. Herunterregulation von *Pls3* oder *Coronin* konnte den Augenphänotyp in Fliegen, die mutierte YARS Formen exprimierten aufheben (Biljana Ermanoska, Albena Jordanova, VIB, Abteilung für Molekulargenetik, Universität Antwerpen, Belgien; persönliche Kommunikation). Durch Größenausschlusschromatographie konnten wir zeigen, dass mutierte YARS Proteine nur zu sehr geringem Anteil in PLS3-reichen Fraktionen vorkommen und im Vergleich zu wildtypischen YARS zum größten Teil in Proteinkomplexen hohen Molekulargewichts vorkommen. Weitere massenspektrometrische Analysen von aufgereinigten großen Protein komplexen mit wildtypischer und mutierten YARS Formen lassen auf ein vermindertes Bindungsvermögen von YARS p.E196K zum Translationsinitiationsfaktor 4B und zum Nuclease-sensitiven Bindungsprotein 1 schließen. Veränderte Oligomerisierungseigenschaften konnten für das CMT Krankheitsgen GARS (Glycin tRNA-Synthetase) nachgewiesen werden. Da unsere massenspektrometrischen Daten das

veränderte Molekulargewicht der YARS Komplexe nicht erklären konnten, vermuten wir, dass die Veränderungen auf unterschiedliche Oligomerisierungseigenschaften des mutierten YARS p.E196K zurückzuführen sind. Co-Immunoprecipitation von mutiertem YARS und PLS3 ließen auf ein reduziertes Interaktionsvermögen schließen. Des Weiteren führte Überexpression von YARS p.E196K in HEK293T Zellen zu einer Verstärkung der FITC-Dextran Aufnahme im Vergleich zur Überexpression von wildtypischer YARS. Die Abnahme der Endozytose in SMA im Gegensatz zur gesteigerten Endozytose in CMT könnten die gegensätzlichen modifizierenden Effekte von PLS3 erklären. Die hier erbrachten Ergebnisse betonen die Rolle des Plastin 3 Proteins im Rahmen der Aktindynamik und Endozytose, und beschreiben die dadurch bedingten gegensätzlichen krankheitsmodulierenden Effekte in zwei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen.